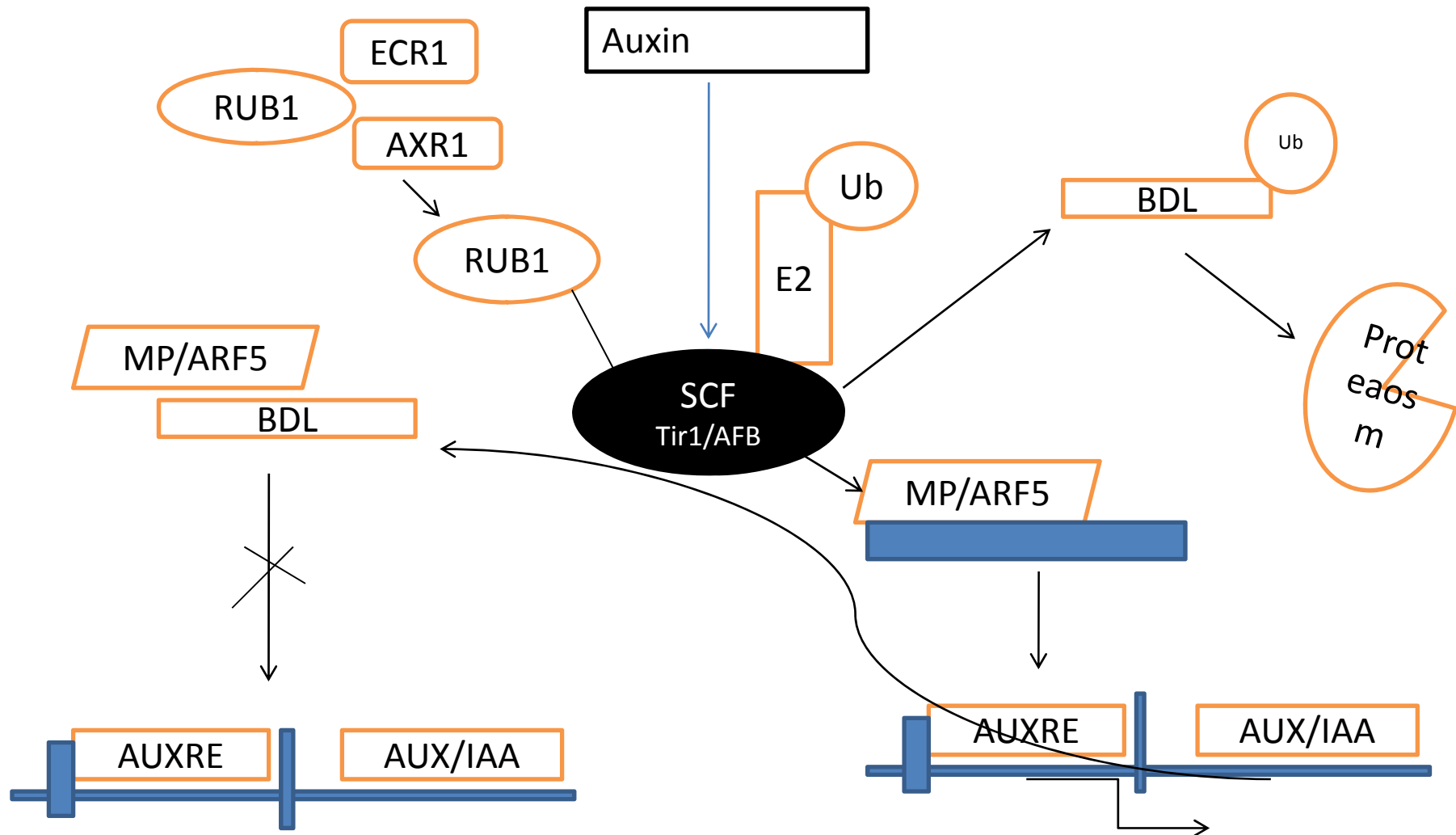


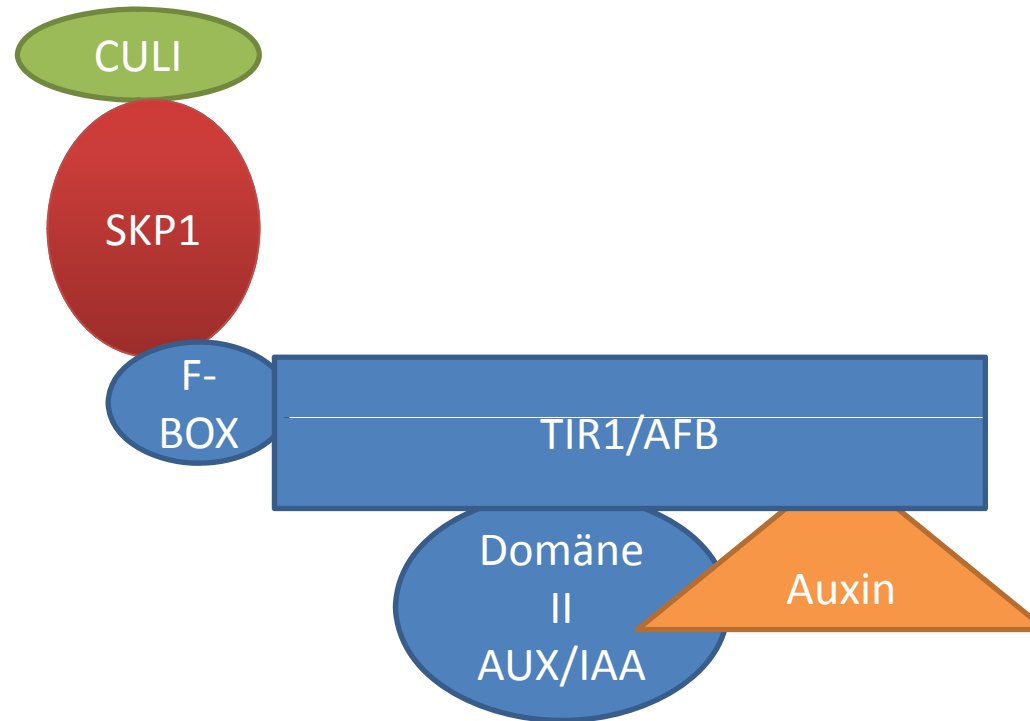
# Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase

Xu Tan<sub>1</sub>, Luz Irina A. Calderon-  
Villalobos<sub>2</sub>, Michal Sharon<sub>3</sub>, Changxue  
Zheng<sub>1</sub>, Carol V. Robinson<sub>3</sub>, Mark Estelle<sub>2</sub>  
& Ning Zheng<sub>1</sub>

# Modell



# Modell



# Ziel

Wie genau binden Auxin und die AUX/IAA's an TIR 1 bzw. ARF ?

Warum bewirken chemisch differente Substanzen wie 2,4-D auxinabhängige responses?

# Methoden

- I) Proteinpräparation und GST pull-down-assay
  - TIR1 und ASK1 wurden in Hi5 insect cells exprimiert
  - IAA7 Proteins wurden in E.coli exprimiert
- II) native-Gelelektrophorese
- III) Kristallisation:
  - Kristallisation ist ein Vorgang bei dem Moleküle aus einer übersättigten Lösung in einen festen Zustand übergehen.

# colorless native polyacrylamide gel electrophoresis

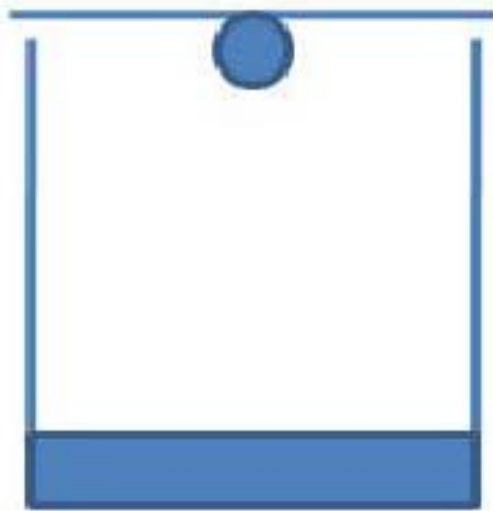
- trennt native also gefaltete Proteine auf
- Wahl des Puffersystems hängt vom PI und anderen Eigenschaften des Proteins ab
  - Wird genutzt um relevante Konformationen zu zeigen
  - Komplexbildungen zwischen Proteinen

# Kristallisation

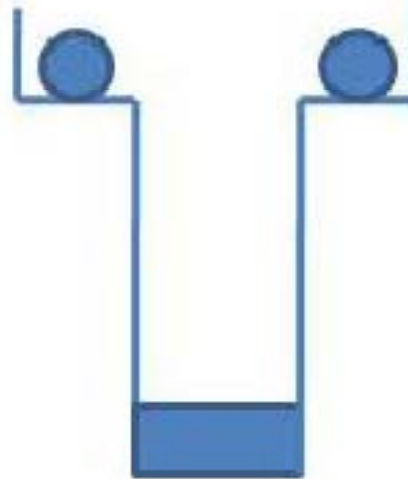
- - Überexpression und Reinigung der Proteine
- - Kristallisationsbedingungen sind schwer vorher zu sagen – „Trial and Error“
  - pH-Wert
  - Temperatur
  - Puffer etc.

# Kristallisation

- -Prinzip der Dampfdiffusion



Handling Drop



Sitting Drop



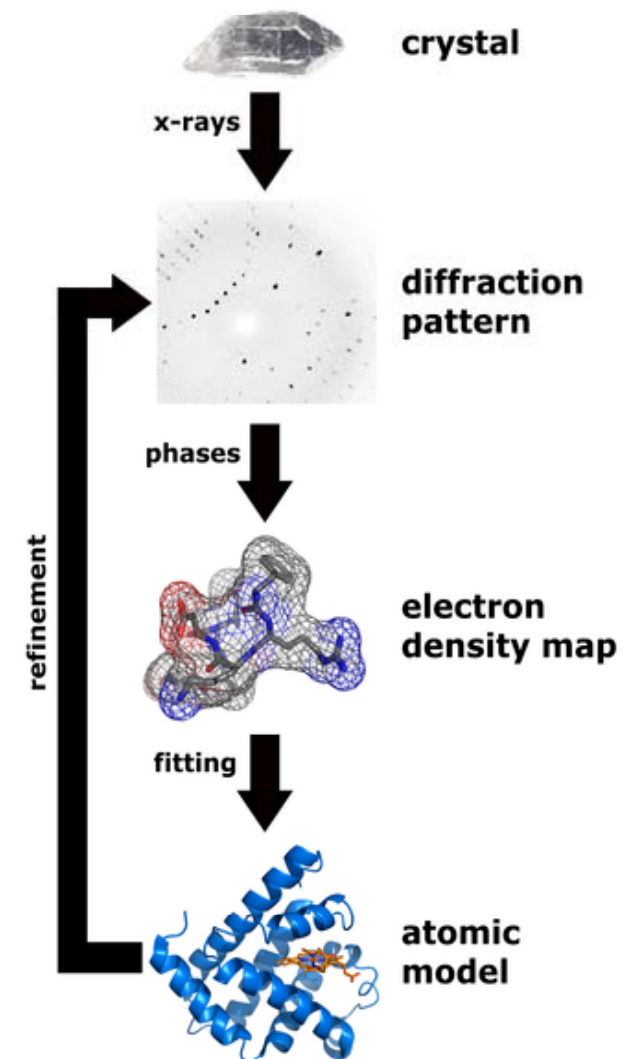
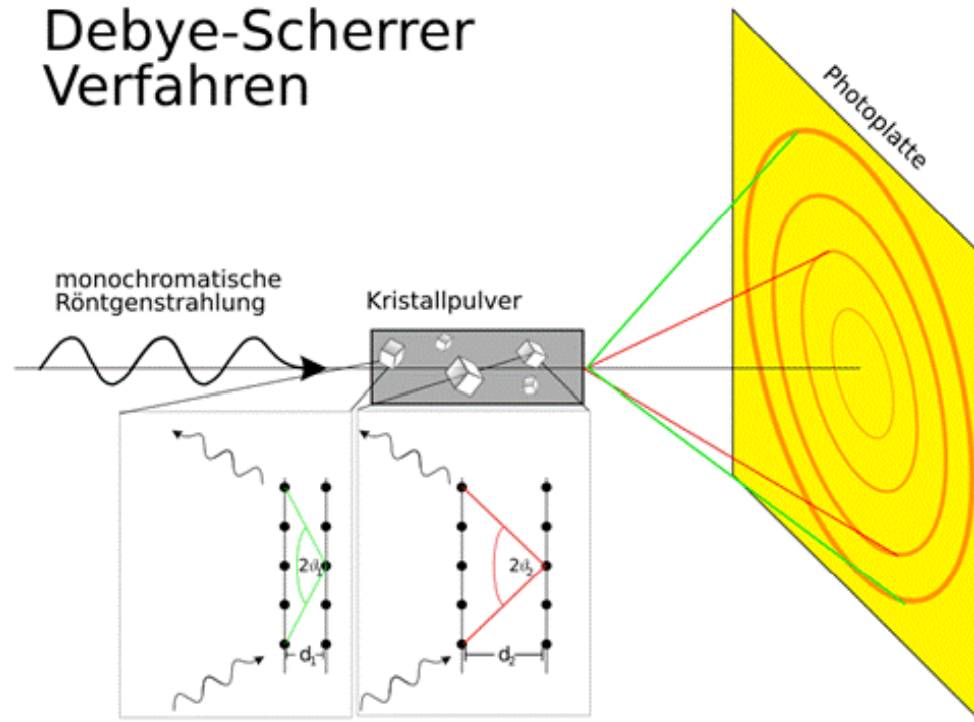
# Kristallisation

- Kristalle bestehen aus einer Vielzahl von Einheitszellen
- Nach erfolgreicher Kristallisation werden sie mittels Röntgenbeugung charakterisiert.



# Röntgenstruktur

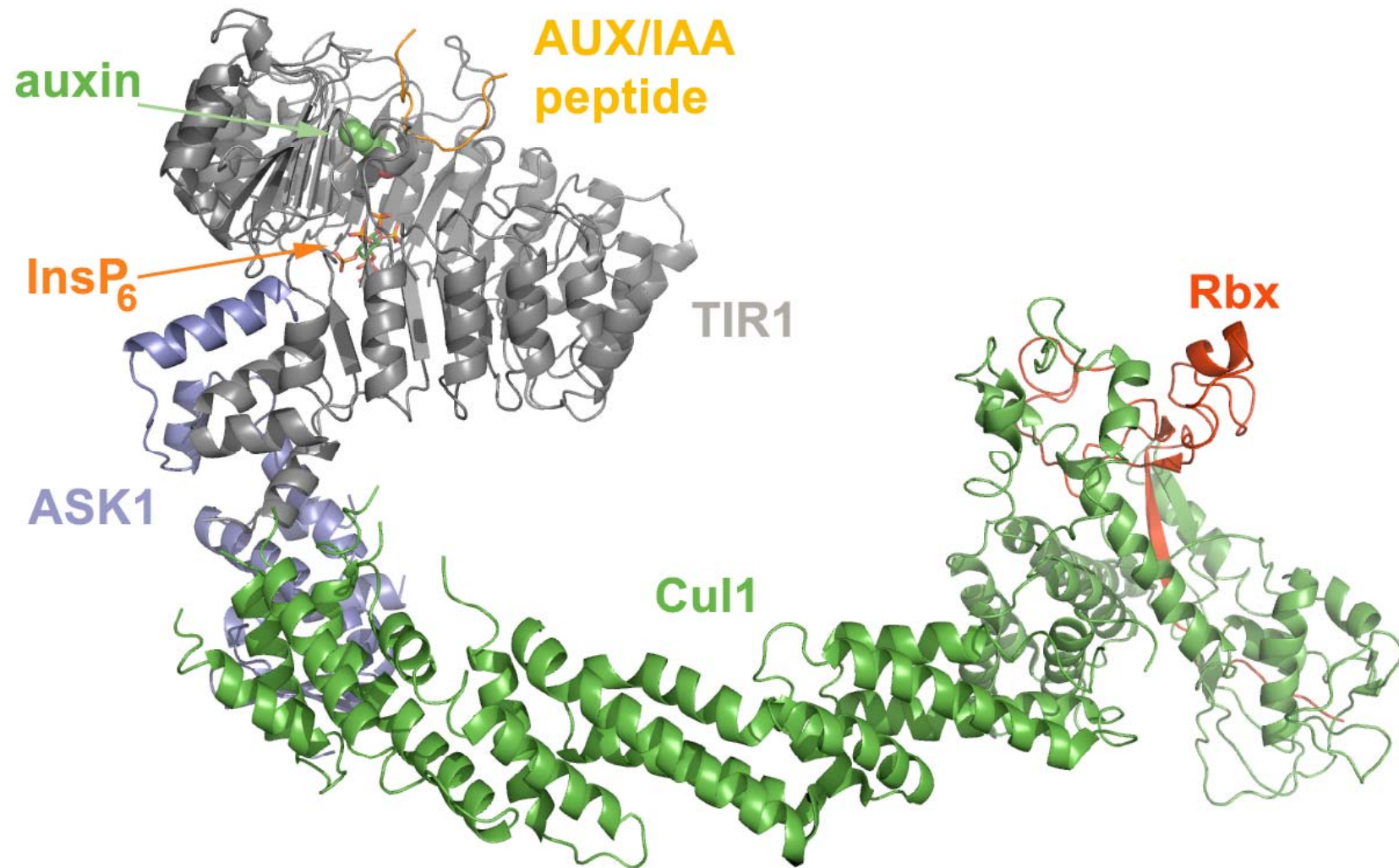
## Debye-Scherrer Verfahren



# Ergebnis

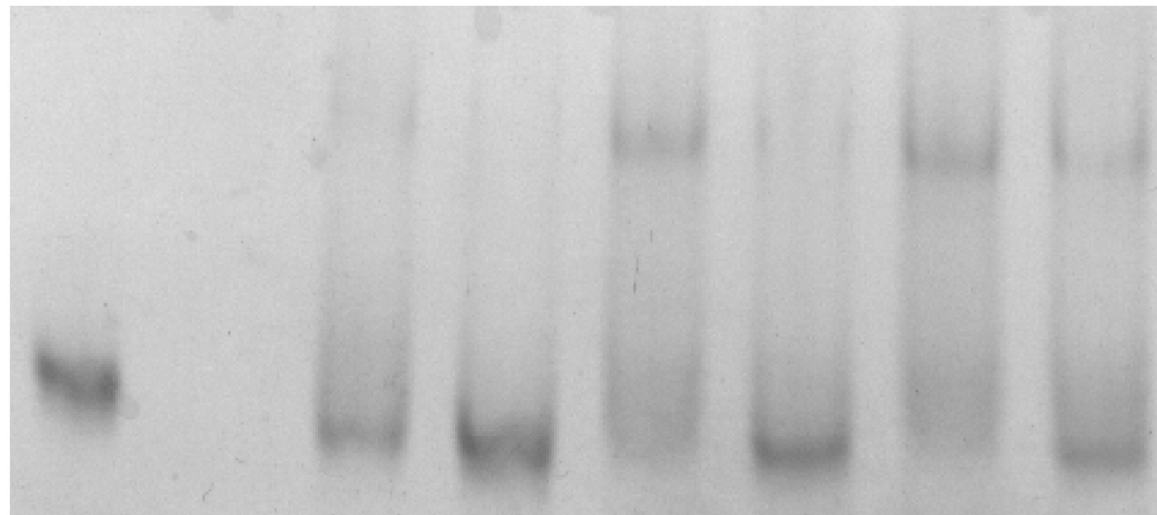
- Man erhält Röntgenbeugungsaufnahme
  - Aus den Informationen lässt sich die Elektronendichte ermitteln
  - Aus der Elektronendicht können nun Aussagen über Struktur gemacht werden

# SCF-Komplex



# Basale Affinität zwischen IAA / TIR1

–	–	+	–	+	–	+	–	2,4-D (100 $\mu$ M)
–	1.1	1.1	1.1	2.2	2.2	4.4	4.4	IAA7 ( $\mu$ g)
+	–	+	+	+	+	+	+	TIR1-ASK1 (2 $\mu$ g)

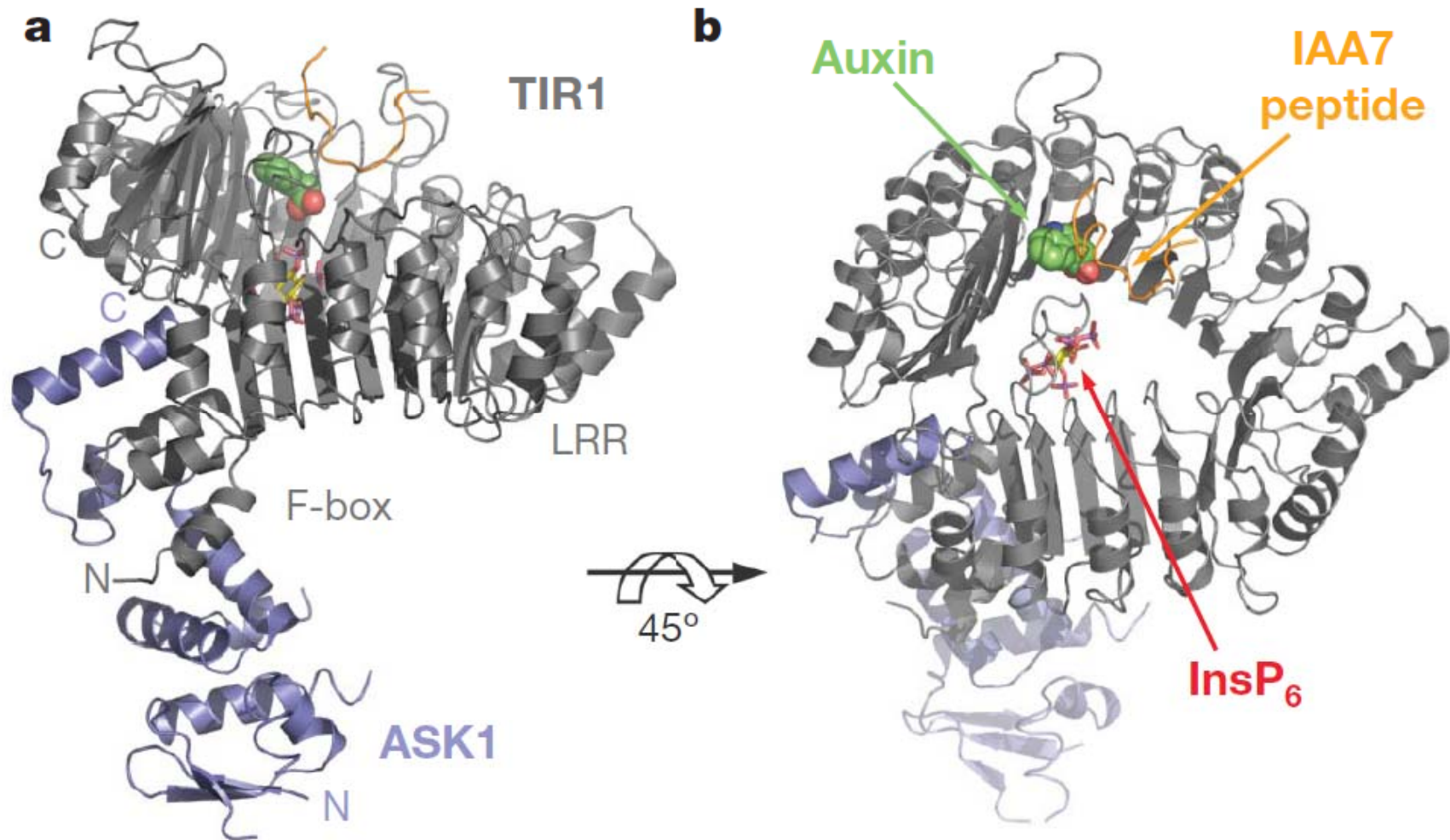


TIR1-ASK1-IAA7-2,4-D

TIR1-ASK1

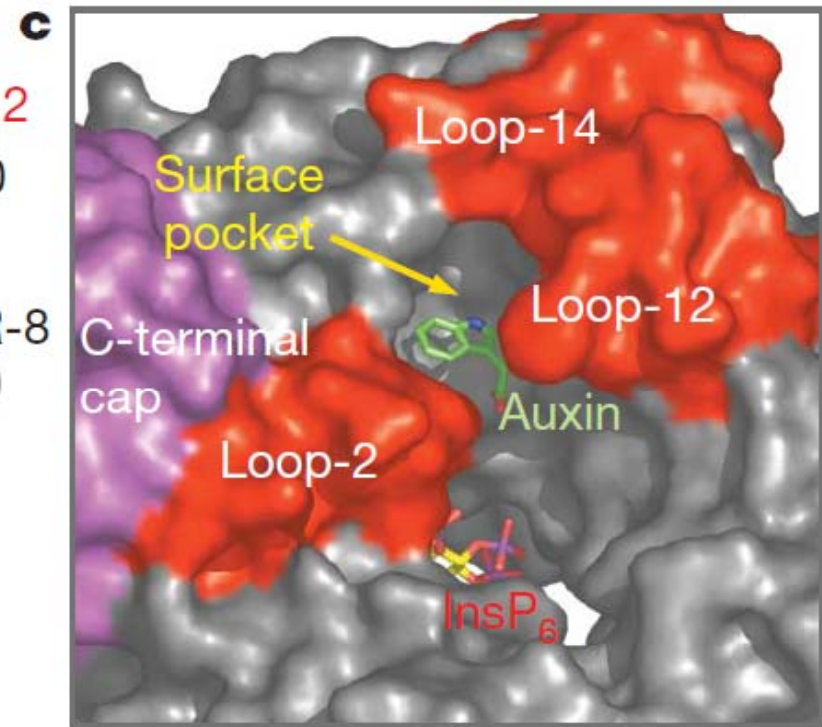
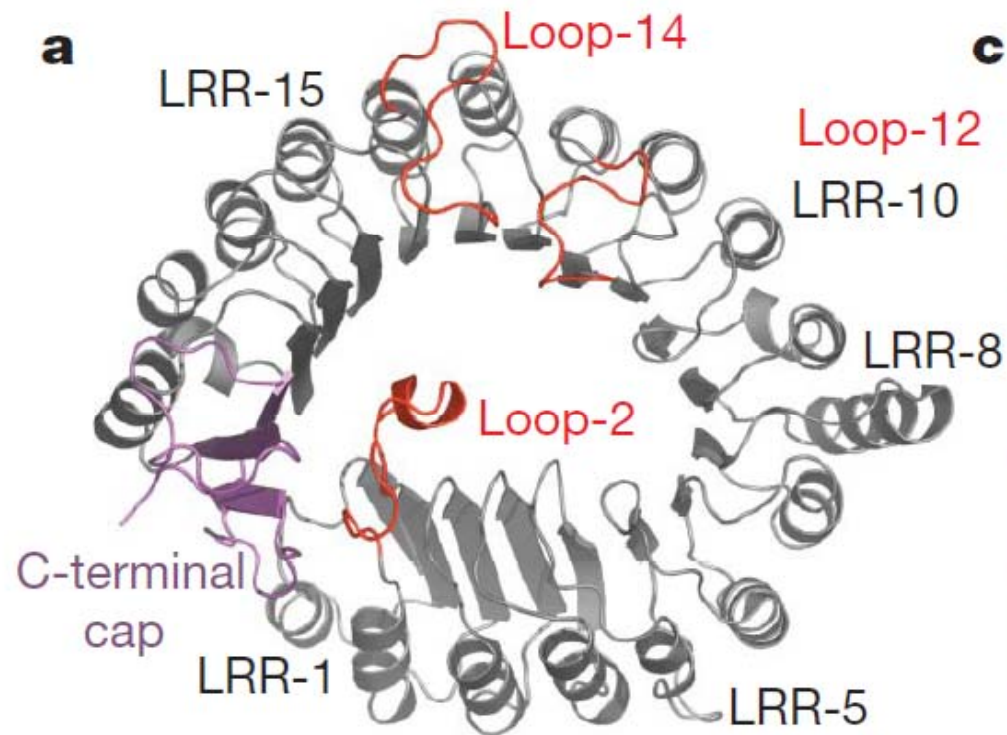
1 2 3 4 5 6 7 8

# Kristallstruktur – Auxin + IAA gebunden

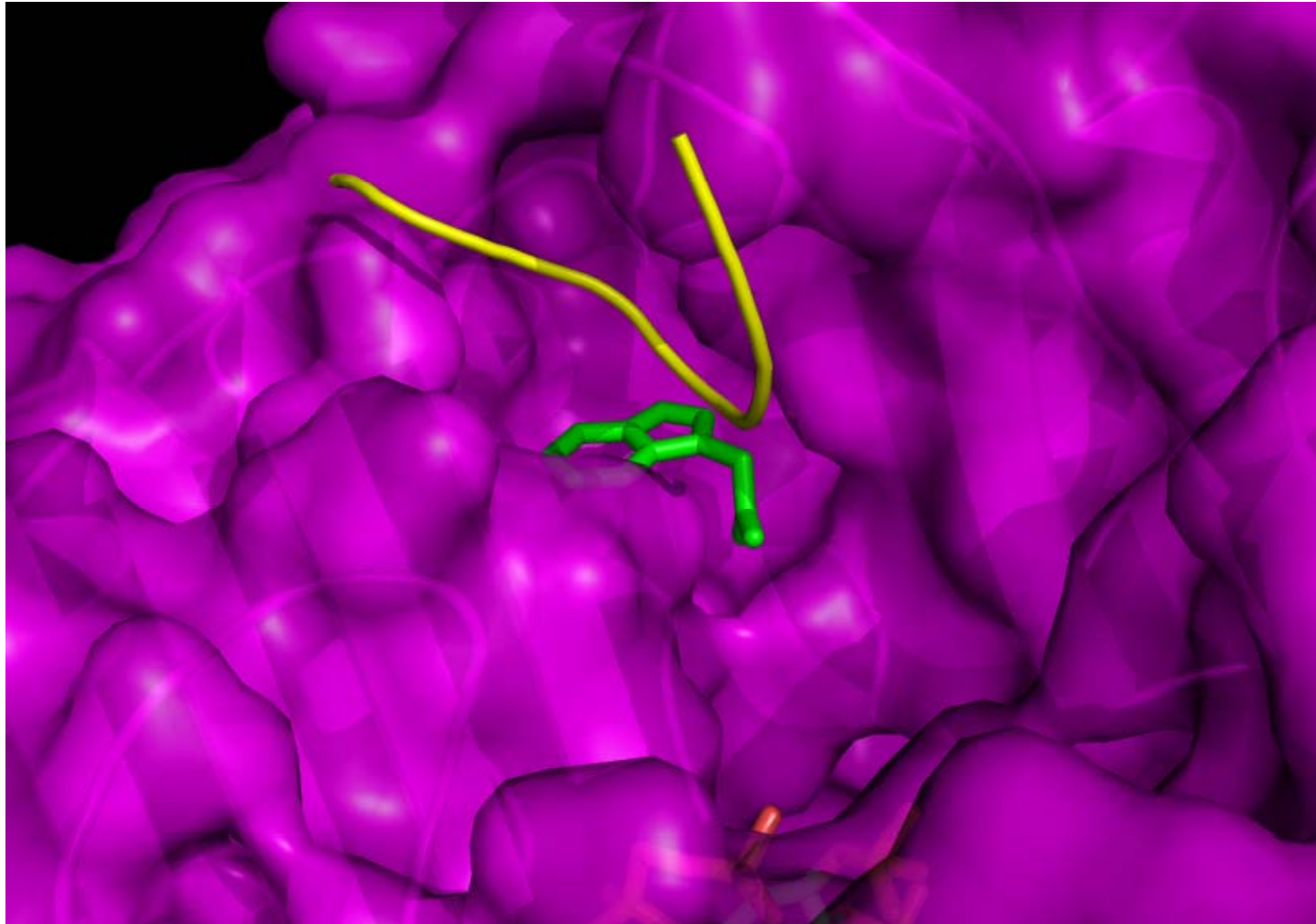




# Auxin binding pocket



# Auxin binding pocket II

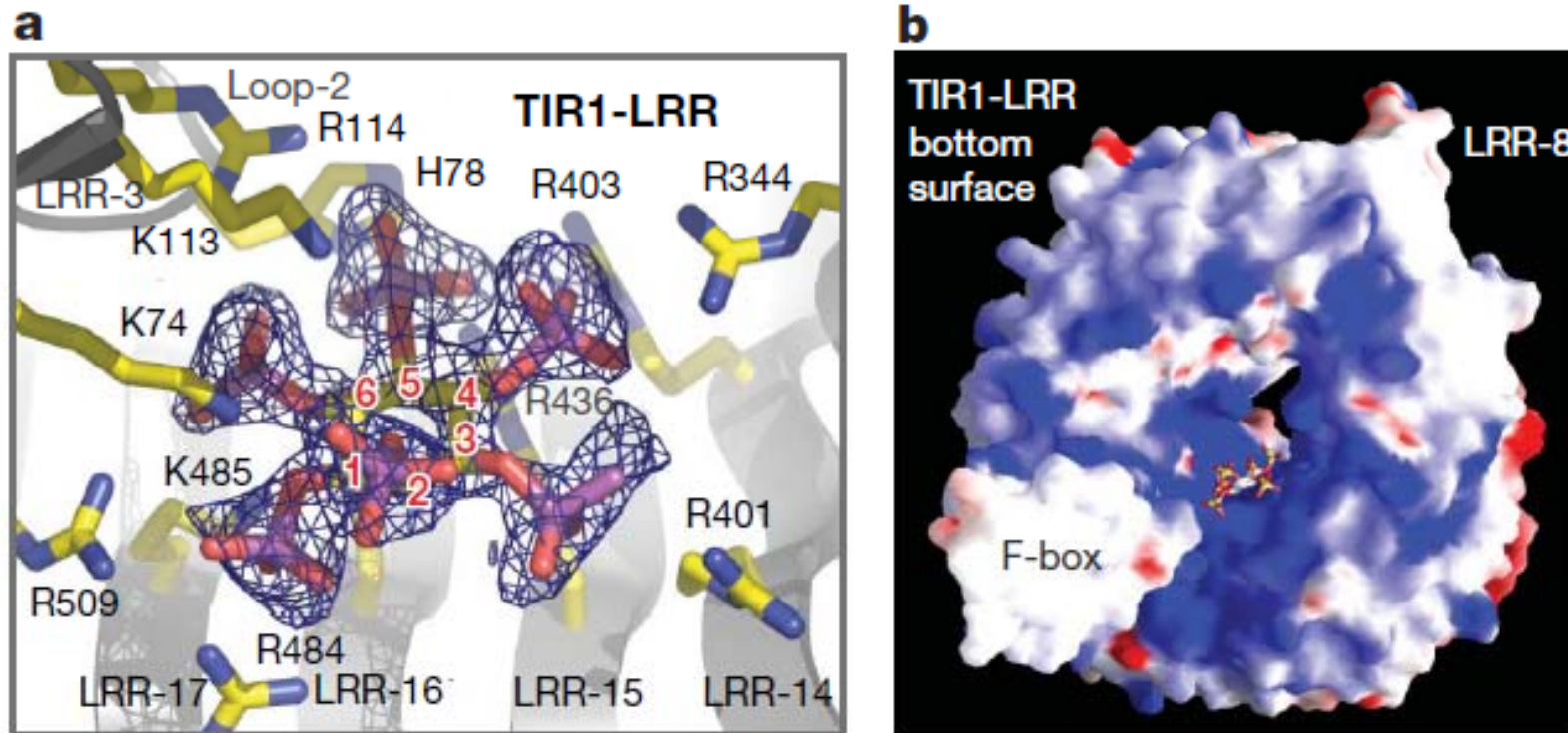




# Fazit I

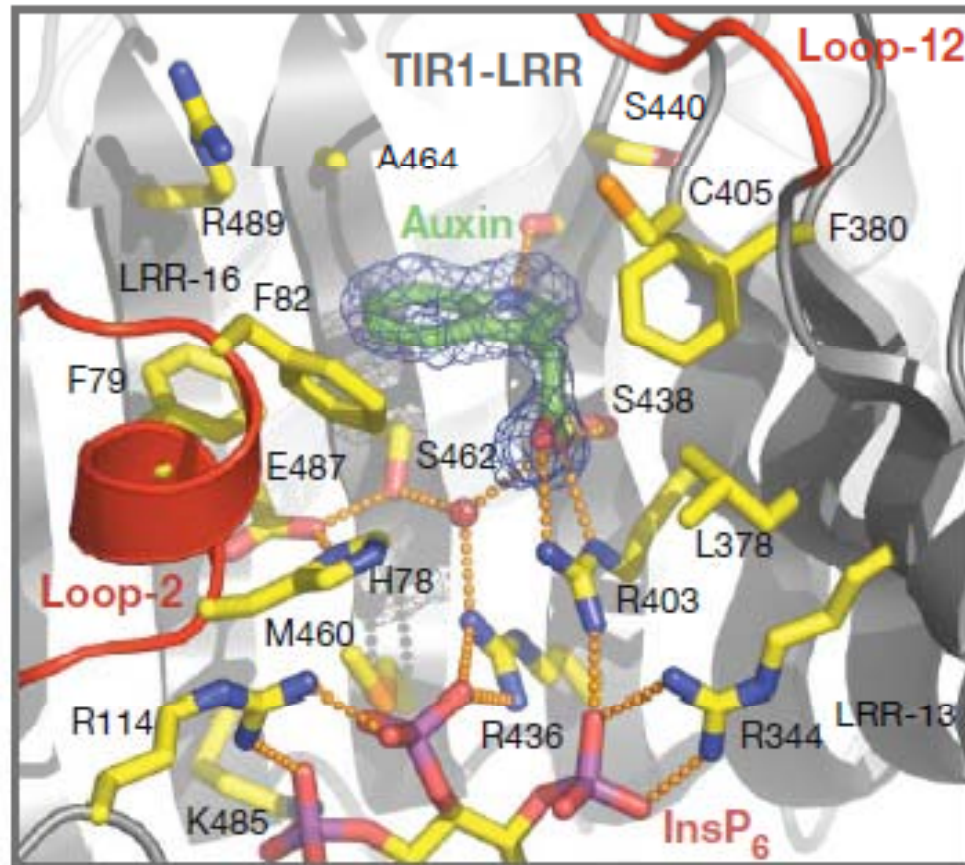
- Hydrophobe Wechselwirkung zwischen IAA und TIR I führt zu basaler Bindung
- Auxin und IAA Bindung erfolgt proximal und auxininduziert
- Cofaktor = Myo-Inositol-Hexakisphosphat
- Nicht planare Struktur durch LRR 8
- Bindetasche durch loops 2, 12, 14 und C-terminal cap

# Cofaktor stabilisiert durch Salzbrücken

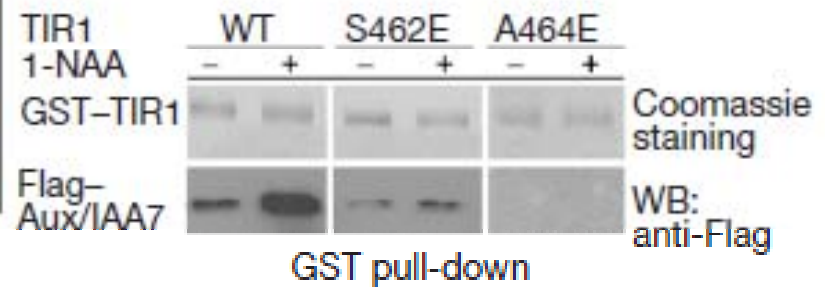


# Auxin binding pocket III

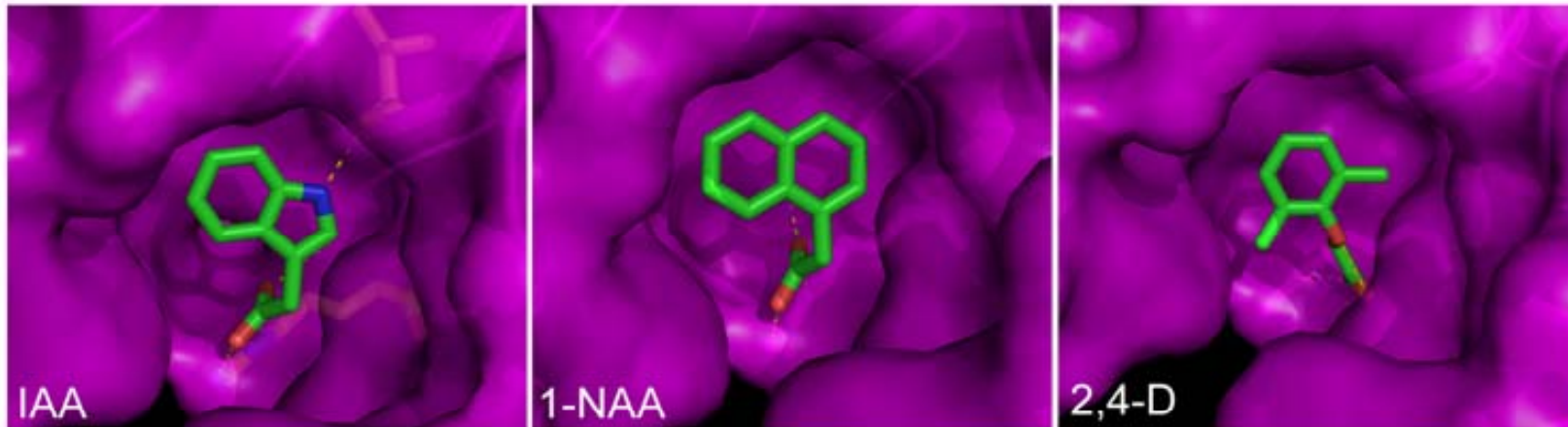
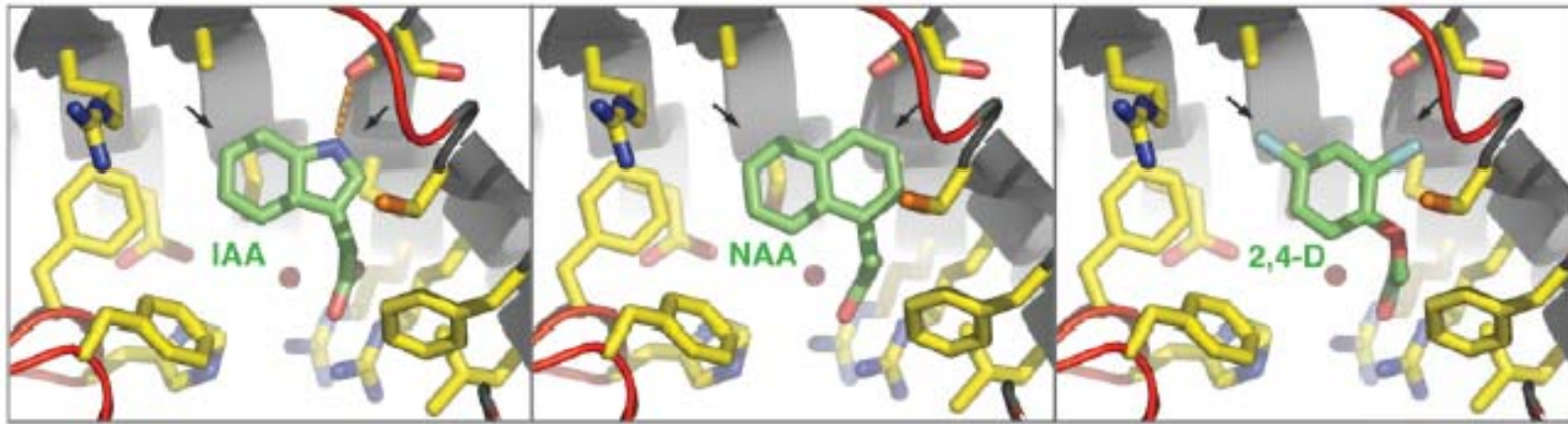
**a**



**c**



# Vergleich Auxin und Derivate



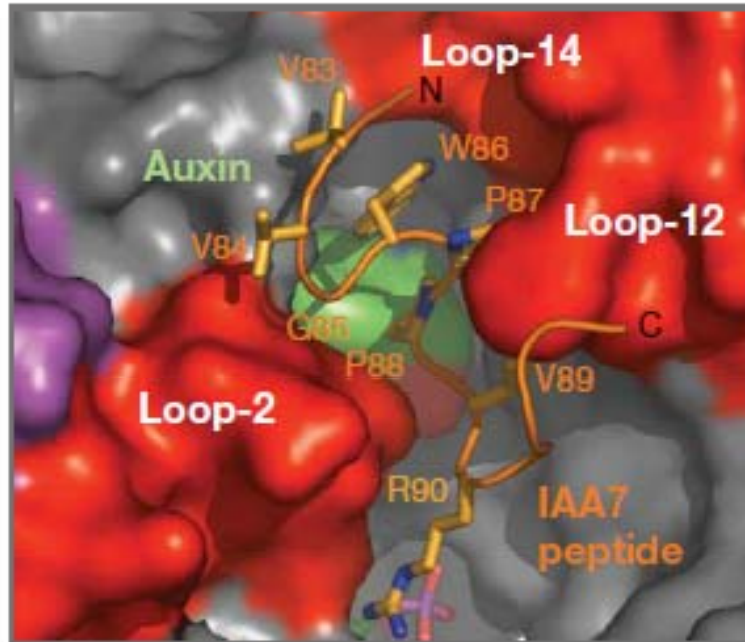
# Fazit II

- Cofaktorbildung sehr stark, evtl. Beitrag zur Proteinstabilität
- Essentiell für Bindung: Carboxylgruppe + hydrophobes, planares Ringsystem
- Austausch zu polaren, großen Aminosäuren führt zu verminderter Bindung
- Unterschiedliche Affinität der Derivate

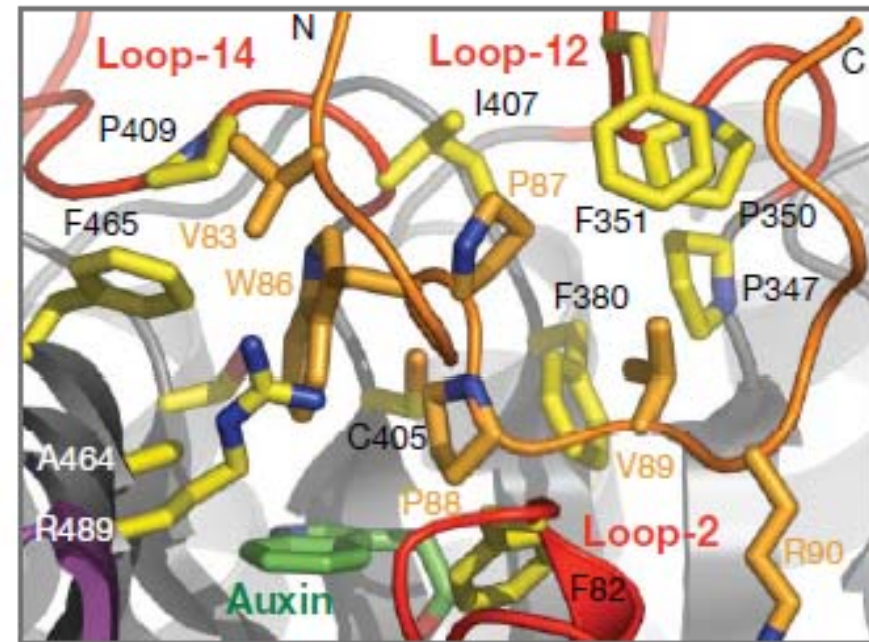


# TIR I + Auxin + IAA7 Domäne 2

**a**

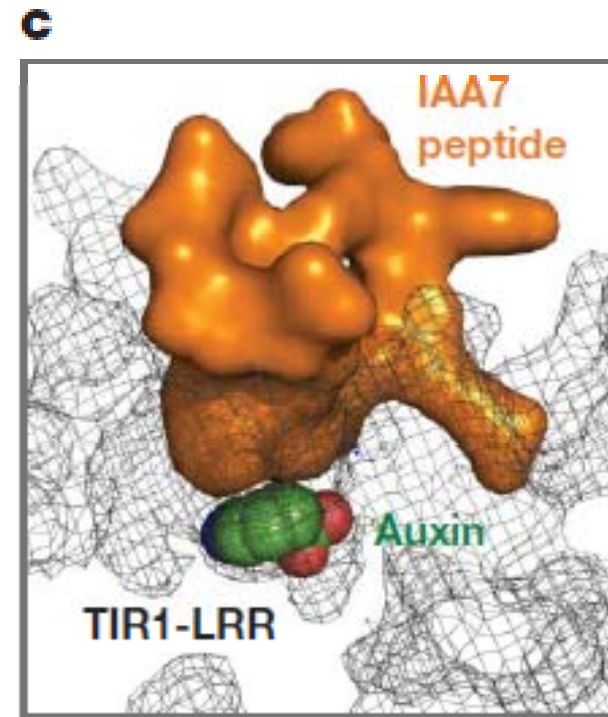


**b**



# Fazit III

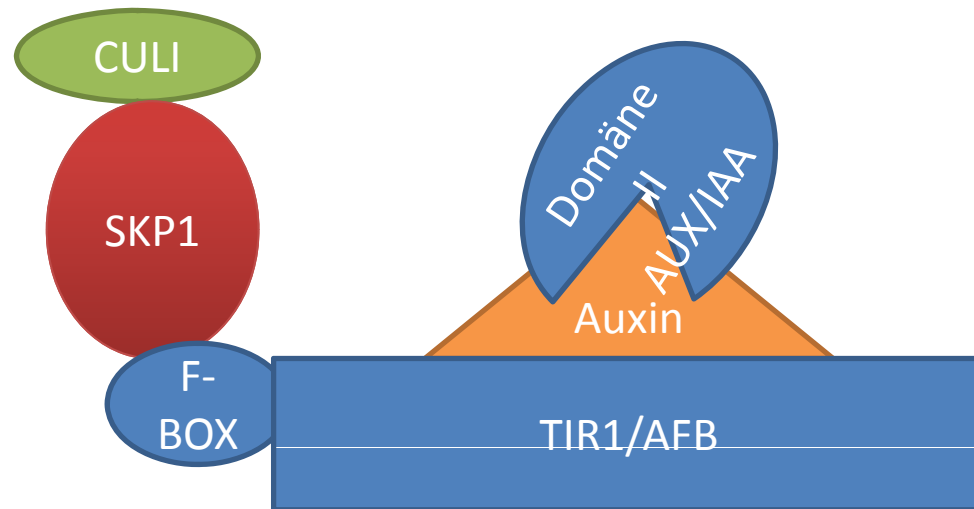
- Auxin fungiert als „molecular glue“
- Hydrophobe Oberfläche für Interaktion zwischen TIR I und IAA
- Nicht allosterisch (keine Konformationsänderung), sondern nicht kovalente Wechselwirkung







# Neues Modell



# Offene Fragen

- In Welcher Verbindung steht der InsP6 Stoffwechsel mit der Auxinantwort ?
- Gibt es weitere Cofaktoren?
- Gibt es andere Moleküle die als „molecular glue“ fungieren ?
- Welchen Einfluss haben die anderen AUX/IAA Domänen auf den Abbau ?
- Hat die räumliche Ausrichtung dieser einen Einfluss?
- Nach welcher Kinetik verlaufen Assoziation und Dissoziation der Auxin bzw. Aux/IAA Bindung ab ?